

AZ OTKA K-72812 KUTATÁSI TÁMOGATÁS ZÁRÓJELENTÉSE

I. A KUTATÁSI TERV INDOKLÁSA

A DOTE Élettani Intézetében 1995 óta végzett hallásélettani kutatás folytatását képező projekt a cochlearis magban található ioncsatornák, valamint az itt érvényesülő modulációs mechanizmusok tanulmányozására fókuszált; különös tekintettel a magban található szinaptikus kapcsolatok sajátságainak és befolyásolhatóságának megismerésére. A hangérzékelés során a Corti-szerv szőrsejtjei és a ganglion spirale neuronjai a hanghullámokat akcióspotenciál- (AP) sorozatokká alakítják, melyek a VIII. agyideg révén érik el a nucleus cochlearist (CN). A magban a hallási információ dekódolásának első lépése zajlik, aminek eredményeként a hangingerek érzékelhető tulajdonságaira vonatkozó információk egymástól részben elkülönülnek, és párhuzamos felszálló csatornák révén továbbítódnak a hallórendszer centrálisabb területeire. A most zárult munka fő célja a CN ezen komplex tevékenységét lehetővé tévő egyes lépések elemzése volt.

II. A KUTATÁS EREDMÉNYEI

A zárójelentésben összefoglalt eredmények részét képezik a projekt kidolgozása során publikált 11 *in extenso* dolgozatnak, így a jelen összefoglalóban csak a legfontosabb megállapításokat emeljük ki.

1. A HCN-csatornák megoszlása és funkcionális jelentősége

Vizsgáltuk, hogy biocitines jelölés segítségével azonosított óriássejtekről elvezethető-e a hyperpolarizáció-aktivált nem-specifikus kationáram (I_h). Igazoltuk egy olyan áramkomponens jelenlétét, amelynek biofizikai sajátságai megfeleltek az I_h ismert tulajdonságainak. Az áramkomponens egyértelmű azonosítását az biztosította, hogy az csaknem teljesen blokkolhatóan bizonyult ZD7288-cal, az I_h ismert gátlószerével.

A kísérletek következő fázisában meghatároztuk az egyes HCN-csatornaalegységek expresszióját – mRNS szinten a CN egészére vonatkozóan, fehérjeszinten pedig az óriássejtekre koncentrálna. A kísérletekhez fiatal (10–14 nap) és felnőtt patkányokat (30 nap) egyaránt alkalmaztunk. A magból származó mintákban, életkortól függetlenül, legnagyobb mennyiségben a HCN2-specifikus, valamint kisebb mennyiségben pedig a HCN1- és HCN4-specifikus mRNS fordult elő. A HCN3-specifikus mRNS mennyisége elhanyagolható volt. Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredménye teljes összhangban állt az mRNS szintű adatokkal. Az immunjelölődés intenzitása az életkor előrehaladtával csökkent.

Az I_h óriássejtekben játszott szerepét elektrofiziológiai mérésekben vizsgáltuk. A h-áram gátlása mintegy 6 mV-os hiperpolarizációt okozott, és a spontán aktivitást mutató

neuronokban jelentősen csökkentette az AP-tüzelés frekvenciáját. A tüzelési frekvencia depolarizáló áram alkalmazásával visszaállítható volt. A spontán kialakuló gátló posztszinaptikus áramok (sIPSC) frekvenciája ZD7288 hatására jelentősen csökkent, amplitúdójuk változatlan maradt, a leszálló szár időállandója pedig jelentősen megnőtt. A gátlószer jelenlétében a spontán kialakuló serkentő posztszinaptikus áramok (sEPSC) frekvenciája csökkent, amplitúdójuk és kinetikájuk pedig változatlan maradt. A mag felületes és mély rétegében végzett elektromos ingerléssel kiváltható IPSC-k leszálló szára ZD7288 jelenlétében lassult, de amplitúdójuk nem változott; a kiváltott EPSC-k amplitúdója nem-szignifikáns csökkenést mutatott. Az eredmények alapján arra következtetünk, hogy az I_h szerepet játszik az óriásneuronok membrán- és tüzelési sajátságainak meghatározásában, és befolyásolja szinaptikus kapcsolataik integrációját. A befolyás erőteljesebbnek tűnik fiatal egyedekben, ami arra utal, hogy a h -áram hozzájárul a hallórendszer postnatalis érésével összefüggő változások kialakításához [11].

A munkaterv keretében elvégeztük a HCN-alegységek megoszlásának vizsgálatát tengerimalac ganglion spirale neuronjaiban. A Western-blottal és az immunjelöléssel kapott adatok azt jelzik, hogy valamennyi HCN-csatornaalegység jelen van a ganglion spirale neuronok mindkét típusában, ám az egyes sejtek között jelentős különbség van az expresszió mértékében. Ez a megállapítás magyarázatul szolgálhat az I_h ganglion spirale neuronokon korábban megfigyelt változékonyságára [2].

2. A cochlearis mag projekciós neuronjainak azonosítása, feszültségfüggő K^+ -csatornáik szerepének vizsgálata

A munka első lépéseként a nucleus cochlearis dorsalis részében (DCN) található pyramis-neuronok és óriássejtek kvantitatív morfológiai összehasonlítását végeztük el. Az elektrofiziológiai mérések során biocitinnel feltöltött sejtekről konfokális mikroszlóp segítségével rétegfelvételeket készítettünk, amik alapján lehetővé vált a neuronok háromdimenziós rekonstrukciója. A sejtek morfológiai jellemzését a szómát és a dendritfákat leíró 17 paraméter meghatározása alapján végeztük el. Megállapítottuk, hogy a többváltozós analízis kellően megbízható módszer az óriássejtek és a pyramis-neuronok megkülönböztetésére, valamint azok más sejtfeleségektől való elkülönítésére. Bizonyítottuk, hogy olyan esetekben is lehetőség van a sejtek megbízható morfológiai azonosítására, amikor azok nem a szokásos megjelenésüket mutatják – pl. nem teljes jelölődés vagy szokatlan metszési sík okán [8].

Jelen pályázatot megelőzően elvégeztük a feszültségfüggő K^+ -csatorna alegységek nucleus cochlearison belüli feltérképezését is [1], de a kapott eredmények nem elegendőek egyértelmű következtetések levonásához.

3. Kolinerg moduláció hatása a nucleus cochlearis egyes sejtjeinek működésére

A rendelkezésre álló mérőhely bővítése lehetővé tette a cochlearis neuronok bemeneteinek elektromos ingerlését, ezáltal a bemenő axonok és a cochlearis mag neuronjai közötti szinaptikus átvívódás tanulmányozását. Ezen technika alkalmazásával kezdtük vizsgálni a kolinerg moduláció hatását az óriássejtek posztszinaptikus áramaira. A kísérletek során vékonyszelet preparátumban található óriássejteken mértük a karbakol hatását a kiváltott posztszinaptikus áramokra és a rövid távú szinaptikus plaszticitásra. Megállapítottuk, hogy a DCN felszínes és mély rétegébe helyezett stimuláló elektródával egyaránt kiválthatók IPSC-k. A molekuláris réteg felől alkalmazott sorozatingerlés hatására az IPSC-k erős depresszióját figyeltük meg, ugyanakkor a mély réteg felől stimulálva vagy minimális depressziót, vagy enyhe facilitációt tapasztaltunk. A kolinerg stimuláció a molekuláris réteg felől kiváltott IPSC-ket nem befolyásolta, a mély réteg felől kiváltottakat pedig erősen blokkolta. Megállapítottuk, hogy a DCN felszínes és mély rétegének ingerlésével EPSCk is kiválthatók.

Vizsgáltuk a kolinerg ingerlés óriássejtekre kifejtett közvetlen hatását is. Karbakol alkalmazása csökkentette a sejt felszíni membrán káliumkonduktanciáját, aminek következtében a sejtek depolarizálódtak. Valamennyi megfigyelt kolinerg hatás kivédhető volt atropinnal, jelezve a muszkarinerg receptorok szerepét a hatás kialakulásában. Specifikus receptorblokkolók hatásai elemezve arra a következtetésre jutottunk, hogy a posztszinaptikus kolinerg hatás zömmel M4-es, kisebb részben M3-as receptorok részvételével alakul ki, ugyanakkor a preszinaptikus hatásokért M2-, M3- és M4-receptorok egyaránt felelősek [4].

A mérőhely bővítésének befejezése lehetővé tette fluoreszcens festékek alkalmazását, megengedve a DCN agyszelet-preparátumban elhelyezkedő sejtek aktivitásának vizsgálatát. A sejteket az általuk produkált citoplazmatikus kalciumkoncentráció-változások (kalciumtranziensek) alapján azonosítottuk, továbbá tanulmányoztuk a kolinerg ingerlés hatását a neuronok aktivitására. Jóllehet ezen technika alkalmazása nem szerepelt az eredeti munkatervben, alkalmazása jelentősen megkönnyítette a neuronális aktivitás nyomonkövetését – egyidejűleg akár nagyszámú sejtben is (multicelluláris leképezés).

Bizonyítottuk, hogy a gyors kalciumtranziensek túlnyomó többségét AP előzi meg, tehát azok neuronális eredetűek. A lassú kalciumtranziensek esetében AP-ok nem voltak kimutathatók, így ezen jelek nem-neuronális (feltehetően glia) eredetűek. Ezen adatok

birtokában a gyors kalciumtranzienseket használtuk fel a neuronok aktivitásának tanulmányozására.

A fluoreszcenciatrianziensek feldolgozása érdekében egy olyan számítógépes programot fejlesztettünk, amelyik képes volt a regisztrált fluoreszcenciaemissziós-jelek zajsűrésére, a neuronális és nem-neuronális kalciumtranziensek elkülönítésére, és kinetikai jellemzőik meghatározására. A módszert a DCN-ban található szemcsesejteket befolyásoló kolinerg moduláció hatásainak vizsgálatára alkalmaztuk. Megállapítottuk, hogy karbakol extracelluláris alkalmazására a szemcsesejtek egy része aktivitásának növelésével reagál. Agonisták és antagonisták segítségével bizonyítottuk, hogy a hatás döntően M3-típusú muszkarinerg receptorok közvetítésével valósul meg. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a szemcsesejtek aktivitását a kolinerg stimuláció fokozza [9].

A szelet-preparátumokban kapott adatok arra utaltak, hogy a CN gliasejtjein (vagy azok egy részén) ugyancsak érvényesül kolinerg befolyás. Mivel egyre több kísérleti adat mutat a gliasejtek, azon belül az astrocyták, interneuronális szinaptikus működéseket befolyásoló szerepére, a további kísérleteinket astrocytákra is kiterjesztettük. A méréseket 7–9 napos patkányok cochlearis magjaiból készített primer astrocytatenyészeteken végeztük. Kimutattuk, hogy karbakol csak az astrocyták egy részében vált ki kalciumkoncentráció-növekedést, jöllehet ATP adására, kevés kivételtől eltekintve, a karbakolra nem reagáló astrocyták is produkáltak kalciumkoncentráció-növekedést. A reagáló sejtek egy része egy gyors kalciumtranzienst követően elnyújtott választ produkált, míg más sejteken csak az átmeneti komponens volt megfigyelhető. Astrocyta sejtcsoportokon kialakuló kalciumkoncentráció-változások időbeliségét elemezve arra következtettünk, hogy egyes esetekben a tranziensek egyik sejtről a másakra történő terjedésével is számolni kell („kalcium-hullám”). Megállapítottuk, hogy a kalciumtranziensek létrehozásában az M1- és az M3-típusú receptorok egyaránt jelentősek. Az eredmények alapján nyilvánvaló, hogy amikor a kolinerg modulációnak a CN működésére gyakorolt hatását kívánjuk értelmezni, a mechanizmusban az astrocyták részvételét is számításba kell venni [5].

4. A cochlearis magban található Purkinje-szerű neuronok vizsgálata.

Korábbi (részben saját) tanulmányok felhívták a figyelmet arra, hogy a CN-ban, elsősorban a DCN felszínes rétegében, kimutathatók olyan neuronok, amelyek megjelenése emlékeztet a kisagyi Purkinje-sejtekére. Mivel ezen sejtek tulajdonságairól és szerepéről igen hiányosak a rendelkezésre álló információk, célul tűztük ki ezen neurontípus behatóbb vizsgálatát. Megállapítottuk, hogy a Purkinje-szerű neuronok morfológiájuk alapján három csoportba oszthatók. Morfológiai hovatartozásuktól függetlenül, tartós depolarizációra

valamennyi sejt AP-tüzeléssel válaszolt, míg hyperpolarizáció hatására rajtuk I_h kialakulása figyelhető meg. A Purkinje-szerű neuronokról mind EPSC-k, mind IPSC-k elvezethetők; utóbbiak létrehozásában mind glycinerg, mind GABAerg szinapszisok részt vesznek. Korábban ismert erős calbindin-pozitivitásuk mellett – a cerebelláris Purkinje-sejtekhez hasonlóan – a sejtek cerebellint is tartalmaznak, ám a cerebellin sejten belüli eloszlása más, mint a Purkinje-sejtek esetében. GAD-pozitivitásuk alapján valószínű, hogy a Purkinje-szerű sejtek GABAerg neuronok. Eredményeink arra utalnak, hogy a CN ezen sejtípusa nem tekinthető funkció nélküli, „eltévedt” Purkinje-sejtnek, hanem integráns részét képezi a DCN neuronhálózatának [3].

5. A munkatervben nem szereplő kutatási tevékenység

A munkaterv kidolgozása során előre nem tervezett kísérletsorozatokra is sor került. Ezen vizsgálatok kollaboráció keretében történtek, és szervesen illeszkedtek a projekt gerincét képező munkához. Ezek során elemeztük az immunszuppresszív hatású tacrolimus alkalmazásának hatását a parallel-rostok és a piramissejtek közötti szinapszisokra. Megállapítottuk, hogy a vegyület neuroprotektív jellegű, kombinált pre- és posztszinaptikus hatást fejt ki. Ezen eredmények nem magyarázzák a tacrolimus kezelés során jelentkező, a hallásfunkciót érintő mellékhatásokat [7].

A hallóidegrostok és a CN elülső részében található bushy-sejtek közötti óriásszinapszist modellként alkalmaztuk foszforilációs-defoszforilációs folyamatok neurotranszmisszióra gyakorolt hatásának elemzéséhez. Megállapítottuk, hogy mind a miozin-foszfataz, mind a RhoA-aktivált kináz módosítja a neurotranszmissziót. A két fehérje hatása részben ellentétes, azok kialakulásában pre- és posztszinaptikus mechanizmusok egyaránt részt vesznek [10].

A pályázat kidolgozása során felkérésre egy áttekintő cikkben foglaltuk össze a ganglion spirale neuronok főbb sajátosságaira vonatkozó ismereteket [6].

A beszámolóban felsorolt közlemények között van három, amelyek kollaborációs munka gyümölcseként születtek. Két esetben [9,11] olyan munkáról van szó, melyek befejezésében a külföldön tartózkodó korábbi témavezető fontos kiegészítő méréseket végzett. A harmadik esetben [8] az együttműködés intézményen belüli; a cikk kísérletes anyaga azonban teljes egészében laboratóriumunkból származik, míg a kapcsolódó analízist az együttműködő kollégák végezték. Laboratóriumunk részvétele mindhárom munkában meghatározó, ami indokolja az adatok saját eredmények között történő szerepeltetését.

6. A munkaterv nem teljesített vállalásai

A pályázat munkaterve 4 évre elosztva 17 pontban fogalmazta meg az elvégzendő feladatokat, ebből 4 pont teljesítése elmaradt. Az érintett terület a feszültségfüggő K^+ -csatornák cochlearis neuronok működését befolyásoló szerepének funkcionális vizsgálata. A biztató előkísérletek ellenére a személyi és tárgyi feltételek módosulása nem tette lehetővé a szükséges mérések elvégzését.

III. PROBLÉMÁK, AKADÁLYOK

A munkaterv végrehajtása során váratlan mértékű akadályt jelentett az Intézet felújítása, ami miatt a mérőrendszert többször át kellett telepíteni, és a kísérletek végzését mintegy 12 hónapra fel kellett függeszteni.

IV. SZEMÉLYI VÁLTOZÁSOK

A kutatásban eredetileg részt vevő munkatársak közül három (köztük a korábbi témavezető) véglegesen távozott, egy munkatárs kétéves tanulmányúton vett részt, egy kolléga pedig az utolsó két évben másik intézetbe került, és gyakorlatilag nem vett részt a munkában. A fenti változások okozta nehézségeket új résztvevők csatlakozásával és új témavezető megbízásával hidaltuk át. A pályázat kidolgozása mindamellett jelentősen lelassult, és a személyi változások a tervezett kutatás súlypontjainak módosulását is előidézték. A személyi és tárgyi feltételek alakulása miatt került sor a futamidő egy évvel való meghosszabbítására is.

V. A KÖLTSÉGTERV ELTÉRÉSEI

A támogatás felhasználása során a futamidő meghosszabbítása miatti áttervezésen túl lényeges változás nem történt, a kutatói időráfordítás mértéke érdemlegesen nem változott.

PUBLIKÁCIÓK

1. Rusznák, Z., Bakondi, G., Pocsai, K., Pór, Á., Kosztka, L., Pál, B., Nagy, D., Szücs, G. (2008) Voltage-gated potassium channel (Kv) subunits expressed in the rat cochlear nucleus. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 56, 443-465.
2. Bakondi, G., Pór, Á., Kovács, I., Szücs, G., Rusznák, Z. (2009) Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, cation non-selective channel subunit expression pattern of guinea pig spiral ganglion cells. *Neuroscience* 158, 1469-1477.
3. Kőszeghy, Á., Pál, B., Pap, P., Pocsai, K., Nagy, Zs., Szücs, G., Rusznák, Z. (2009) Purkinje-like cells of the rat cochlear nucleus: A combined functional and morphological study. *Brain Research* 1297, 57-69.
4. Pál, B., Kőszeghy, Á., Pap, P., Bakondi, G., Pocsai, K., Szücs, G., Rusznák, Z. (2009) Targets, receptors and effects of muscarinic neuromodulation on giant neurones of the rat dorsal cochlear nucleus. *European Journal of Neuroscience* 30, 769-782.
5. Pap, P., Kőszeghy, Á., Szücs, G., Rusznák, Z. (2009) Cytoplasmic Ca^{2+} concentration changes evoked by cholinergic stimulation in primary astrocyte cultures from the rat cochlear nucleus. *Hearing Research* 255, 73-83.
6. Rusznák, Z., Szücs, G. (2009) Spiral ganglion neurones: an overview of morphology, firing behaviour, ionic channels and function. Invited topical review. *Pflügers Archiv* 457, 1303-1325.
7. Szabó, L., Rusznák, Z., Szücs, G., Asztalos, L., Pál, B. (2010) Effect of tacrolimus on the excitatory synaptic transmission between the parallel fibers and pyramidal cells in the rat dorsal cochlear nucleus. *Transplantation Proceedings* 42, 2339-2343.
8. Kecskes, Sz., Kőszeghy, Á., Szücs, G., Rusznák, Z., Matesz, C., Birinyi, A. (2012) Three-dimensional reconstruction and quantitative morphometric analysis of pyramidal and giant neurons of the rat dorsal cochlear nucleus. *Brain Structure and Function*. Epub ahead of print (DOI 10.1007/s00429-012-0457-7).
9. Kőszeghy, Á., Vincze, J., Rusznák, Z., Fu, Y., Paxinos, G., Csernoch, L. Szücs, G. (2012) Activation of muscarinic receptors increases the activity of the granule neurones of the rat dorsal cochlear nucleus — a calcium imaging study. *Pflügers Archiv* 463, 829-844.
10. Lontay, B., Pál, B., Serfőző, Z., Kőszeghy, Á., Szücs, G., Rusznák, Z., Erdődi, F. (2012) Protein phosphatase-1M and Rho-kinase affect exocytosis from cortical synaptosomes and influence neurotransmission at a glutamatergic giant synapse of the rat auditory system. *Journal of Neurochemistry* 123, 84-99.
11. Rusznák, Z., Pál, B., Kőszeghy, Á., Fu, Y., Szücs, G., Paxinos, G. (2012) The hyperpolarization-activated non-specific cation current (I_h) adjusts the membrane properties, excitability, and activity pattern of the giant cells in the rat dorsal cochlear nucleus. *European Journal of Neuroscience*. Epub ahead of print (DOI:10.1111/ejn.12116).